

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

Marko Jurković

7019/PT

Konstrukcija seta diploidnih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u svrhu uspostave semi-kvantitativne western blot metode za analizu proteina stanične stijenke

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija

Mentor: Doc. dr. sc. Igor Stuparević

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Konstrukcija seta diploidnih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u svrhu uspostave semi-kvantitativne western blot metode za analizu proteina stanične stijenke

Marko Jurković, 0058205976

Sažetak: Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* određuje morfološke karakteristike stanice, kao što su oblik i čvrstoća, te doprinosi integritetu stanice tijekom rasta, diobe i stresnih okolišnih uvjeta. Građena je najvećim dijelom od polisaharida glukana i hitina te proteina. Cilj ovoga rada bio je uspostava semi-kvantitativne western blot metode za analizu proteina stanične stijenke. Prvo su konstruirani haploidni sojevi kvasca oba tipa parenja kojima je gen *BGL2* označen hemaglutininskom sekvencom. Potom su iz ovih sojeva i haploidnih sojeva divljeg tipa procesom parenja konstruirani diploidni sojevi kojima su jedna, odnosno obje kopije gena *BGL2* označene. Između proteinskih ekstrakata konstruiranih diploidnih sojeva detektirana je jasna razlika u intenzitetu signala vrpce proteina stanične stijenke Bgl2-HA, čime je pokazano da je provedena semi-kvantitativna western blot metoda pogodna za relativnu kvantifikaciju proteina Bgl2-HA.

Ključne riječi: kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, protein Bgl2, stanična stijenka, western blot

Rad sadrži: 30 stranica, 8 slika, 6 tablica, 62 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Doc. dr.sc. Igor Stuparević

Pomoć pri izradi: Ana Novačić, mag. ing. biotechn.

Datum obrane: 16. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food technology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Construction of yeast *Saccharomyces cerevisiae* diploid strains for the purpose of developing a semi-quantitative western blot method for analysis of cell wall proteins

Marko Jurković, 0058205976

Abstract: Cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae* defines morphological features of the cell, such as shape and rigidity, and is a key factor in cell integrity during growth, mitosis and exposure to stressful environmental factors. Major components of the cell wall are polysaccharides glucan and chitin, as well as proteins. The goal of this thesis was to develop a semi-quantitative western blot method for analysis of cell wall proteins. First, haploid yeast strains of both mating types in which *BGL2* gene was tagged by hemagglutinin sequence were constructed. These strains and wild type haploid strains were then mated to construct a set of diploid strains in which one or both copies of *BGL2* gene were tagged. Protein extracts from this set of diploid strains displayed a distinct difference in signal intensity of cell wall protein Bgl2-HA band, thereby showing that developed semi-quantitative western blot method is suitable for relative quantification of Bgl2-HA protein.

Keywords: Bgl2 protein, cell wall, yeast *Saccharomyces cerevisiae*, western blot

Thesis contains: 30 pages, 8 figures, 6 tables, 62 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: assistant prof. Igor Stuparević, PhD

Technical support and assistance: Ana Novačić, mag. ing. biotechn.

Defence date: July 16th 2018

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.1.1. Životni ciklus kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.1.2. Parenje kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.1.3. Genetičko inženjerstvo kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
2.2. Stanična stijenka kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
2.2.1. Proteini stanične stijenke	5
2.2.2. Protein Bgl2.....	6
2.3. Metoda western blot.....	7
3. MATERIJALI I METODE.....	8
3.1. Materijali	8
3.1.1. Kemikalije i enzimi.....	8
3.1.2. Sojevi kvasca, plazmid, oligonukleotidi	9
3.1.2.1. Sojevi kvasca	9
3.1.2.2. Plazmid	9
3.1.2.3. Oligonukleotidi.....	10
3.1.3. Hranjive podloge za uzgoj kvasca	11
3.2. Metode.....	11
3.2.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	11
3.2.2. Colony PCR.....	12
3.2.3. Gel elektroforeza DNA	13
3.2.4. Određivanje koncentracije DNA pomoću uređaja Qubit fluorimetar	13
3.2.5. Restriksijska analiza	13
3.2.6. Transformacija kvasca	13
3.2.7. Parenje kvasca	14
3.2.8. Izolacija staničnih stijenki	14
3.2.8.1. Tretman staničnih stijenki vrijućim SDS-om	15
3.2.9. Izolacija svih proteina	15
3.2.10. SDS elektroforeza.....	15
3.2.11. Western blot.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Rezultati.....	17
4.1.1. Označavanje gena <i>BGL2</i> hemaglutininskom sekvencom u haploidnim sojevima kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17

4.1.2. Konstrukcija seta diploidnih sojeva kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kojima su jedna, odnosno dvije kopije gena <i>BGL2</i> označene hemaglutininskom sekvencom	19
4.1.3. Semi-kvantitativna western blot analiza proteina Bgl2 u proteinskim ekstraktima konstruiranih diploidnih sojeva.....	20
4.2. Rasprava	22
5. ZAKLJUČCI	24
6. POPIS LITERATURE.....	25

1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je jednostanični eukariotski organizam koji se često koristi kao modelni organizam u znanstvenim istraživanjima budući da mu je cijeli genom sekvenciran (Dujion, 1996), pogodan je za primjenu metoda genetičkog inženjerstva, lako ga je uzgajati u laboratorijskim uvjetima i nepatogen je. Stanična stijenka kvasca kompleksna je izvanstanična struktura (Fleet, 1991; Klis, 1994; Stratford, 1994) koja određuje morfološke karakteristike kvasca, kao što su oblik i čvrstoća, te doprinosi integritetu stanice tijekom staničnog rasta, diobe i stresnih okolišnih uvjeta (Lesage i Bussey, 2006). Ova organela građena je najvećim dijelom od polisaharida glukana i hitina te proteina (Nguyen-Queyrens i sur., 1998). Poznato je da su proteini stijenke ugrađeni u stijenku putem nekovalentnih i kovalentnih veza s glukanskom mrežom. Cilj ovoga rada bio je uspostava semi-kvantitativne western blot metode za analizu proteina stanične stijenke. Semi-kvantitativna western blot analiza podrazumijeva relativnu kvantifikaciju, odnosno usporedbu količine proteina od interesa u različitim uzorcima. Kako bi se navedeno postiglo, uspoređuje se intenzitet signala vrpce proteina od interesa u različitim uzorcima, uz normalizaciju rezultata. Stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* mogu postojati u haploidnom i diploidnom obliku, pri čemu sadrže 16, odnosno 32 kromosoma. Stanice kvasca haploidnog oblika postoje u dva tipa parenja, **a** i **α**, a stanice diploidnog u **a/α**. Tip parenja određen je informacijom kodiranom lokusom *MAT* na III. kromosomu te do parenja može doći samo između haploida suprotnog tipa parenja. Eksperimentalna strategija korištena u radu bila je konstruirati set diploidnih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kojima su jedna, odnosno dvije kopije gena *BGL2* označene hemaglutininskom sekvencom, kako bi se omogućila uspostava odgovarajuće semi-kvantitativne western blot metode.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je jednostanični eukariotski organizam koji pripada carstvu Fungi. Koristi se u industriji hrane i pića zbog mogućnosti fermentacije šećera u alkohol, farmaceutskoj industriji te u biotehnologiji (Ostergaard i sur., 2000). Također se koristi kao modelni organizam u znanstvenim istraživanjima budući da mu je cijeli genom sekvenciran (Dujion, 1996), lako ga je uzgajati u laboratorijskim uvjetima i nepatogen je. Mnogo gena kvasca je homologno genima viših eukariota, zbog čega su istraživanja molekularnih procesa u stanicama kvasca relevantna za stanice viših eukariota, primjerice za proučavanje starenja, regulacije ekspresije gena, prijenosa signala, staničnog ciklusa, metabolizma, apoptoze i drugih staničnih procesa (Karathia i sur., 2011). U prirodi se kvasac *S. cerevisiae* najčešće nalazi u toplim, vlažnim područjima u blizini izvora šećera. Stanice kvasca su ovalnog oblika promjera 5-10 μm i mogu postojati u haploidnom i diploidnom obliku, pri čemu sadrže 16, odnosno 32 kromosoma. Stanice kvasca haploidnog oblika postoje u dva tipa parenja, **a** i **α** , a stanice diploidnog u **a/ α** . Tip parenja određen je informacijom kodiranom lokusom *MAT* na III. Kromosomu - ako se u tom lokusu nalazi sekvenca *MATa*, kvasac je **a** tipa parenja, a ako se u tom lokusu nalazi sekvenca *MAT α* , kvasac je **α** tipa parenja (Tamarin, 1999.).

2.1.1. Životni ciklus kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac se razmnožava pupanjem, odnosno mitozom. U idealnim uvjetima, stanica kvasca se podijeli otprilike svakih 90 minuta. Tijekom mitoze, svih 16 kromosoma haploida se replicira i zatim razdijeli između stanice majke i stanice kćeri. Stanica kćer izdvaja se kao pup iz stanice majke, a budući da je nešto manja od stanice majke, mora narasti prije inicijacije replikacije kromosoma. U slučaju da u okolišu ponestane nutrijenata, stanica zaustavlja stanični ciklus u fazi G1 u kojoj može preživjeti dok se ne vrate povoljni uvjeti za rast. Stanica kvasca također zaustavlja stanični ciklus u fazi G1 ukoliko se u blizini nalazi stanica kvasca suprotnog tipa parenja. Kvasac **a** tipa parenja proizvodi feromon **a** i na površini ima receptore za feromon **α** , a kvasac **α** tipa parenja obrnuto. Ukoliko se na receptore vežu feromoni suprotnog tipa parenja, stanica kvasca počinje se izduživati prema izvoru feromona te dolazi do fuzije dviju stanica suprotnog tipa parenja, što rezultira nastankom diploidne stanice kvasca tipa parenja **a/ α** . U povoljnim uvjetima, diploid se također razmnožava pupanjem (Tamarin, 1999.). Mejoza nastupa kada je kvasac izložen nepovoljnim okolišnim uvjetima, primjerice nedostatak izvora ugljika ili

dušika. Nedostatak nutrijenata rezultira nastankom četiriju haploidnih spora koje su omotane u ovojnicu koja se naziva askus (Herskowitz, 1988). Na taj način kvasac preživljava nepovoljne uvjete, a kada ponovno nastupe povoljni uvjeti, dolazi do razgradnje askusa te haploidne spore germiniraju u vegetativne stanice koje se dijele mitozom.

2.1.2. Parenje kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac **a** tipa parenja se razlikuje od kvasca **α** tipa parenja u genima lokusa *MAT* na III. kromosomu. Kvasac **a** tipa parenja ima takozvane **a**-specifične gene, *MFA1* i *MFA2*, koji kodiraju za pro-**a**-feromon, te gen *STE2* koji kodira za receptor za **a** feromon. Kvasac **α** tipa parenja ima **α**-specifične gene *MFa1* i *MFa2* koji kodiraju za pre-pro-**α**-feromon i gen *STE3* koji kodira za receptor za **a** feromon. Ukoliko se na receptor veže feromon suprotnog tipa parenja, zaustavlja se stanični ciklus u fazi G1, odnosno prije replikacije DNA, te se stanica počinje izduživati u smjeru feromona. Stanični ciklus se zaustavlja u istoj fazi kod oba tipa parenja kako bi se osiguralo da pri fuziji svaki od haploida ima samo jednu kopiju svakog kromosoma i da fuzijom nastaje diploid. Feromoni također potiču sintezu proteina potrebnih za fuziju stanica i jezgri (Tamarin, 1999).

U prirodi je većina stanica kvasca homotalična, odnosno mogu promijeniti tip parenja. Do promjene tipa parenja može doći samo u stanicama iz kojih je nastala barem jedna stanica kćer pupanjem. Samo u stanici majci dolazi do promjene tipa parenja jer se gen za endonukleazu HO, nužnu za ovaj proces, eksprimira asimetrično. Ekspresija gena *HO* aktivirana je transkripcijskim faktorom Swi5 koji je eksprimiran samo u stanici majci, a u stanici kćeri nije eksprimiran jer je uzvodno od gena *SWI5* vezan represor Ash1 (Haber, 2012). Osim lokusa *MAT*, u genomu kvasca oba tipa parenja nalaze se još regije *HMLa* i *HMRa*, koje nose sekvence *MATa*, odnosno *MATa*, ali su inaktivne. Do promjene tipa parenja stanice majke dolazi u fazi staničnog ciklusa G1, kada endonukleaza HO uvodi dvolančani lom u lokusu *MAT*, koji se procesom homologne rekombinacije popravljaju po regijama *HMLa* ili *HMRa*, ovisno o tipu parenja stanice majke. *MATa* se uvijek popravljaju prema *HMLa* zbog pojačivača rekombinacije RE (engl. Recombination Enhancer). U prisutnosti RE dolazi do jačanja interakcije između *MATa* i *HMLa* te se *MATa* iz tog razloga popravljaju prema *HMLa*, bez obzira što je *HMRa* bliži genu *MATa* od *HMLa*. U slučaju da se radi o kvascu **a** tipa parenja sekvenca u lokusu *MAT* će se popraviti procesom homologne rekombinacije prema sekvenci u *HMRa* i neće djelovati pojačivač rekombinacije jer se regija *HMRa* nalazi bliže lokusu *MAT* (Haber, 2012). Promjenom tipa parenja je osigurano da u prirodi u istoj koloniji postoje oba tipa parenja koji formiraju diploide, budući da je za stanice kvasca to povoljnije. Na primjer, ukoliko dođe do inaktivacije nekog esencijalnog gena, diploid će moći

preživjeti zbog druge funkcionalne kopije. U laboratorijskim istraživanjima najčešće se koriste heterotalični sojevi kvasca *S. cerevisiae*, odnosno sojevi koji ne mogu promijeniti tip parenja. Razlog korištenja heterotaličnih sojeva je lakše provođenje metoda genetičkog inženjerstva jer su dobivene kolonije laboratorijskih sojeva uvijek haploidne. Heterotalični sojevi najčešće imaju deletiran gen koji kodira za endonukleazu HO, zbog čega ne dolazi do uvođenja dvolančanog loma u lokusu *MAT* te posljedično do promjene tipa parenja (Tamarin, 1999).

2.1.3. Genetičko inženjerstvo kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *S. cerevisiae* pogodan je za primjenu metoda genetičkog inženjerstva zbog toga što se stanice kvasca jednostavno transformiraju stranom DNA te je ugradnja strane DNA u genom kvasca olakšana zbog efikasnog procesa homologne rekombinacije. Pri tome, transformirajuća DNA mora sadržavati homologiju s nekim dijelom genoma kvasca minimalne duljine 50-100 parova baza. Transformacija kvasca se najčešće provodi s vektorima koji sadrže gen od interesa i marker gen koji omogućava selekciju transformanata. Vektori koji se koriste mogu biti u obliku kružne plazmidne DNA i u obliku linearne DNA. Danas, zahvaljujući genetičkom inženjerstvu, postoji mnoštvo biotehnoloških i industrijskih sojeva kvasca *S. cerevisiae* koji se koriste u proizvodnji vina, pekarskih proizvoda, biogoriva, bioetanola, hidrolizata i mnogih drugih tehnološki važnih proizvoda. Također se koristi za proučavanje funkcije proteina drugih vrsta budući da su metode genetičkog inženjerstva omogućile ekspresiju različitih heterolognih proteina u kvascu *S. cerevisiae* (Gustafsson i sur., 2004).

2.2. Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Stanična stijenka kvasca kompleksna je izvanstanična struktura (Fleet, 1991; Klis, 1994; Stratford, 1994) koja određuje morfološke karakteristike stanice kvasca kao što su oblik i čvrstoća te doprinosi integritetu stanice tijekom staničnog rasta, diobe i stresnih okolišnih uvjeta (Lesage i Bussey, 2006). Na primjer, kvaščeve stanice mogu podnijeti visoki osmotski tlak zahvaljujući čvrstoći stijenke (Teparić i Mrša, 1997). Sinteza, održavanje i pregradnja strukture stanične stijenke zahtijeva usklađenu aktivnost različitih sintaza, hidrolaza i transglikozidaza, čim se osigurava potrebna čvrstoća, ali u isto vrijeme fleksibilnost stanične stijenke. Stanična stijenka se u pravilu sastoji od oko 85% polisaharida i 15% proteina (Nguyen i sur. 1998), a njihova relativna količina može varirati ovisno o uvjetima i fazi rasta, soju kvasca i okolišnim uvjetima. Oko 20% suhe tvari kvasca *S. cerevisiae* čini stanična stijenka koja se sastoji od oko 50% β -1,3-glukana, 5% β -1,6-glukana, 35% manana i 1–2% hitina, a preostali dio suhe mase čine

manoproteini (Fleet, 1991). Manoproteini čine vanjski, a glukan unutarnji dio strane stanične stijenke (Osumi 1998, 2012; Yamaguchi i sur., 2011). Najzastupljeniji polisaharid stijenke je glukan koji formira mrežu i služi kao sidrena skupina za proteine stanične stijenke i doprinosi osmotskoj stabilnosti. Glukanska mreža sastoji se od β -1,3-glukana i β -1,6-glukana. β -1,3-glukan razgranati je polimer koji je izgrađen od 1500 glukoznih jedinica s β -1,6-međulančanim vezama na kojima se nalazi 50 glukoznih jedinica. Vezan je kovalentno na druge komponente stijenke. Svojim nereducirajućim krajem je vezan na reducirajući kraj hitina i vodikovom vezom za O-glikozilirane manoproteine. Takav način vezanja smanjuje propusnost β -1,3-glukana i učvršćuje stijenku u stresnim uvjetima (Popolo i sur. 1997; Osmond i sur. 1999). Lanci β -1,6-glukana manje su zastupljeni u stijenci od lanaca β -1,3-glukana, a formiraju kovalentne veze s β -1,3-glukanom, hitinom te manoproteinima. Manan je polimer koji se sastoji od jedinica manoze, a vezuje se za proteine u procesima O- i N- glikozilacije stvarajući kemijski inertni vanjski štit koji osigurava poroznost stanične stijenke. Vezanje manana na proteine je postsintetska modifikacija koja utječe na konformaciju, a time i aktivnost proteina te lokalizaciju proteina. Hitin je linearni polimer građen od oko 110 N-acetilglukozamina povezanih β -1,4-glikozidnom vezom i njegova količina varira ovisno o uvjetima rasta. Formira mikrofibrile koje se stabiliziraju vodikovim vezama. Hitina u usporedbi s drugim polisaharidima u staničnoj stijenci ima najmanje, a koncentriran je u pupovima (Kang i sur., 1984). Reducirajući krajevi hitina vezani su za nereducirajuće krajeve β -1,3-glukana i β -1,6-glukana (Kollar i sur., 1995). Hitin je uređene strukture i time pridonosi otpornosti na istezanje stanične stijenke. Hitin tijekom pupanja učvršćuje vrat pupa i čini primarnu pregradu između stanice majke i stanice kćeri (Roncero i Sanchez, 2010; Bi i Park, 2012).

2.2.1. Proteini stanične stijenke

U staničnoj stijenci je identificirano 20-ak manoproteina od kojih je mnogima uloga još uvijek nepoznata (Mrša i sur., 1999). Neki od ovih proteina sudjeluju u izgradnji, održavanju i remodeliranju strukture polisaharidne mreže, ponajviše glukana. Također, doprinose hidrofobnosti stanične stijenke te sudjeluju u procesima flokulacije i aglutinacije (Verstrepen i sur., 2003). Manoproteini mogu biti O- i N-glikozilirani. Glikozilacija kovalentno vezanih manoproteina doprinosi njihovoj ulozi u procesima zadržavanja vode, adheziji te virulenciji (De Groot i sur., 2005). Mutacije koje dovode do aberantne glikozilacije rezultiraju fenotipom koji se odražava preosjetljivošću na stresne okolišne uvjete. O-glikozilirani proteini sadrže manozu vezanu α -manozil vezom na hidroksilirane bočne ogranke serinskih i treoninskih ostataka

(Sentandreu i Northcote, 1968). N-glikozilacija uključuje vezanje oligosaharida N-glikozidnom vezom, između N-acetil glukozamina i asparaginskog ostatka proteina (Dean, 1999). Proces O-glikozilacije odvija se u Golgijevom aparatu dok se N-glikozilacija odvija u endoplazmatskom retikulumu (Dempski i Imperiali, 2002). Proteine stanične stijenke dijelimo u tri skupine, prema načinu kojim su usidreni u stijenci. Prva skupina obuhvaća Scw proteine (Soluble Cell Wall Protein) koji su za komponente stanične stijenke vezani nekovalentno. Druga skupina obuhvaća GPI proteine koju su kovalentno vezani preko β -1,6-glukana na β -1,3-glukan, a imenovani su prema glikozil-fosfatidilinozitolnom sidru na C-kraju proteina, preko kojega se vežu za glukansku mrežu (Montijn i sur., 1994; Mrša i sur., 1997). Treću skupinu čine Pir proteini koji su vezani esterskom vezom za β -1,3-glukan, koji su dobili naziv prema ponavljajućim regijama na N terminalnom kraju (Protein with internal repeats) (Mrša i sur., 1997; Toh i sur., 1993).

2.2.2. Protein Bgl2

Protein Bgl2 pripada skupini nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke, a posjeduje endoglukanaznu i glukanozil-transglukanaznu aktivnost. Ovaj protein molarne je mase 33,5 kDa, ima jedan N-vezan oligosaharid, te mali broj vanjskih grana manoznih lanaca. Može se vezati na hitin, glukan i laminarin (Mrša i sur., 1993). Delecija gena *BGL2* dovodi do povećanja aktivnosti hitin sintaze 1 te time do nakupljanja i abnormalne inkorporacije hitina u staničnu stijenku kvasca *S. cerevisiae* (Kalebina i sur., 2003). Kod mutanta *bgl2* je uočena povećana sinteza hitina i preosjetljivost na tretman zimolijazom, Congo Red-om, Calcofluor White-om te smanjena stopa preživljenja u odnosu na stanice divljeg tipa (Lagorce i sur., 2003; Teparić i sur., 2004). Proučavanjem temperaturno induciranih konformacijskih promjena proteina Bgl2 zaključeno je da ova transglikozilaza ima strukturni blok odgovoran za ugrađivanje u staničnu stijenku kvasca *S. cerevisiae* (Bezsonov i sur., 2010). Uz pomoć bioinformatičkih metoda, otkriven je konzervirani C-terminalni blok proteina Bgl2 sastavljen od 9 aminokiselinskih ostataka-KYSLDCDFS. Ta regija je odgovorna za pravilno usidrenje ove glukanoziltransglikozilaze u staničnu stijenku i potrebna je zbog sposobnosti formiranja fibrila. Pokazano je da je delecijom C-kraja ili cijele sekvence gena *BGL2* znatno smanjeno preživljenje nakon sušenja ili zagrijavanja stanica kvasca (Sabirzyanov i sur., 2017). Delecija gena *SSU21*, koji kodira za jedan od ključnih proteina u sintezi glikozilfosfatidilinozitol (GPI)-sidra, utječe na transport i ugradnju Bgl2 u staničnu stijenku. Preciznost sinteze GPI-sidra neophodna je za izgradnju stanične stijenke i eksperimentalni dokazi sugeriraju snažnu međuovisnost različitih skupina staničnih proteina tijekom njihove ugradnje u staničnu stijenku (Kalebina i sur., 2002).

2.3. Metoda western blot

Western blot široko je korištena analitička metoda u područjima kao što su molekularna biologija, imunogenetika, kemija, biokemija i dr., za detekciju i analizu specifičnih proteina u uzorcima tkiva ili ekstrakata. Razvijena je 1979. godine od strane Harry Towbina u institutu Friedrich Miescher u Švicarskoj (Towbin i Staehlin, 1979). Metoda western blot zasniva se na principu metode Southern blot, a glavna razlika je što se western blotom detektiraju proteini, a Southern blotom DNA (Brunette, 1987). Tri su glavna koraka metode: (1) razdvajanje proteina po veličini SDS elektroforezom, (2) prijenos proteina iz gela na membranu te (3) obilježavanje ciljnog proteina upotrebom odgovarajućeg antitijela koje je moguće vizualizirati (Mahmood i Yang, 2012). Prije razdvajanja proteina gel elektroforezom potrebno ih je denaturirati detergentom SDS (engl. Sodium Dodecyl Sulphate), koji im daje netto negativni naboj, što omogućuje razdvajanje proteina isključivo na temelju njihove molarne mase (Renart i sur., 1979; Towbin i sur., 1979). Sljedeći korak je prijenos razdvojenih proteina s gela na membranu, nitroceluloznu ili polivinildien difluorid membranu (PVDF). Prijenos proteina s gela na membranu obavljao se kapilarnim prijenosom, ali danas je gotovo u potpunosti zamijenjen korištenjem električne struje (Harper i Speicher, 2005). Učinkovitost prijenosa proteina s gela na membranu može se provjeriti bojanjem membrane sa Comassie Brilliant Blue ili Ponceau S (Corley, 2005). Nakon toga, membrana se podvrgava procesu koji se zove blokiranje pri čemu dolazi do zasićenja membrane proteinima kako bi se izbjeglo nespecifično vezanje antitijela na membranu. Membrana se zatim inkubira s antitijelom koje se specifično veže na željeni protein. Antitijelo može biti radioaktivno označeno ili konjugirano s fluoresceinom ili peroksidazom, zbog čega se na odgovarajući način može detektirati na membrani. Ovime je omogućena detekcija proteina od interesa (Mahmood i Yang, 2012; Towbin i Staehlin, 1979).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i enzimi

Agar: Liofilchem (Conyers, SAD)

Adenin, aminokiseline, akrilamid, agaroza, ampicilin, etidij bromid, polietilenglikol (PEG) 4000, SDS, β -merkaptotanol, Triton X-100 - Sigma Aldrich, Merck (Darmstadt, Njemačka)

Kvašćev ekstrakt: Biolife (Milano, Italija)

Pepton, baktotripton - Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, SAD)

Taq DNA polimeraza, deoksiribonukleotidi, restrikcijski enzimi, standardi za DNA elektroforezu (1 kb i 100 bp DNA ladder) – New England Biolabs (SAD)

Standardi za proteinsku elektroforezu (LMW) – Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)

Amonijev persulfat, N, N' metilenbisakrilamid – Fluka (Buchs, Švedska)

N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), Ponceau S – Serva (Heidelberg, Njemačka)

Antitijela anti-HA-peroksidaza, higromicin B – Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Njemačka)

ECL - otopine za razvijanje imunoblota – Biorad (Hercules, SAD)

Glukoza – Gram Mol (Zagreb, Hrvatska)

Sve ostale kemikalije krutog agregatnog stanja koje su korištene pri eksperimentalnom radu nabavljene su od proizvođača Acros Organics, Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD), dok su kiseline i alkoholi nabavljeni od proizvođača Carlo Erba (Milano, Italija).

3.1.2. Sojevi kvasca, plazmid, oligonukleotidi

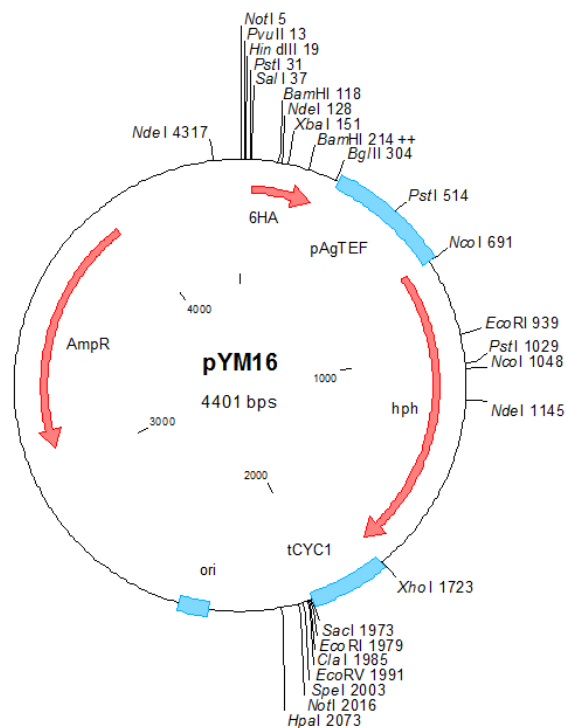
3.1.2.1. Sojevi kvasca

Tablica 1. Sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* korišteni u ovom radu.

SOJ	GENOTIP	IZVOR
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann i sur., 1998
BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann i sur., 1998
BY4741 <i>BGL2-HA</i>	BY4741 <i>BGL2-HA(hph)</i>	Ovaj rad
BY4742 <i>BGL2-HA</i>	BY4742 <i>BGL2-HA(hph)</i>	Ovaj rad
BY4743	<i>MATa/a his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 LYS2/lys2Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Ovaj rad
BY4743 <i>BGL2/BGL2-HA</i>	BY4743 <i>BGL2/BGL2-HA(hph)</i>	Ovaj rad
BY4743 <i>BGL2-HA/BGL2</i>	BY4743 <i>BGL2-HA(hph)/BGL2</i>	Ovaj rad
BY4743 <i>BGL2-HA/BGL2-HA</i>	BY4743 <i>BGL2-HA(hph)/BGL2-HA(hph)</i>	Ovaj rad

3.1.2.2. Plazmid

Plazmid pYM16 je kružna molekula DNA veličine 4401 parova baza. Sadrži hemaglutininsku (HA) sekvencu te gen *hph* koji stanicama omogućuje rezistenciju na antibiotik higromicin (slika 1). Ovaj plazmid korišten je kao kalup u PCR reakciji kojom je konstruirana kazeta za označavanje gena *BGL2* hemaglutininskom sekvencom, kako je opisano u poglavlju 3.2.1.



Slika 1. Restriksijska mapa plazmida pYM16.

3.1.2.3. Oligonukleotidi

Tablica 2. Oligonukleotidi (početnice) korišteni u ovom radu.

OPIS	SLIJED NUKLEOTIDA 5'→3'	VELIČINA UMNOŽENOG FRAGMENTA DNA
Umnažanje kazete BGL2-HA	fwd:ACTTCAAGTGACAATTTGAAATACTCCTTGG ACTGTGACTTTTTCACGTACGCTGCAGGTCGAC rev:AAGGAAAAAGCCATTCTTGTTTAAAGAGTAT TTTTAAAGCGTTCAATCGATGAATTCGAGCTCG	2056 pb
Provjera tipa parenja kvasca	MATa: ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG MATα: GCACGGAATATGGGACTACTTCG MAT: AGTCACATCAAGATCGTTTATGG	MATa: 544 pb MATα: 404 pb

3.1.3. Hranjive podloge za uzgoj kvasca

Za uzgoj kvasca *S. cerevisiae* korištena je tekuća hranjiva podloga YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) sastava: pepton 20 g/l, kvaščev ekstrakt 10 g/l, glukoza 20 g/l. Kruta YPD podloga pripremljena je na isti način, uz dodatak 15 g/l agara. Za selekciju stanica koje sadrže gen za rezistenciju na antibiotik higromicin, u krutu hranjivu YPD podlogu dodano je 300 µg/ml ovog antibiotika. Za selekciju diploidnih stanica, korištena je tekuća podloga YNB (Yeast Nitrogen Base) sastava: YNB 6,7 g/l, smjesa aminokiselina i drugih tvari rasta bez metionina i lizina 2 g/l, glukoza 20 g/l.

3.2. Metode

3.2.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) je metoda koja služi za *in vitro* umnažanje fragmenta DNA, a u ovom je radu korištena za umnažanje kazete BGL2-HA pomoću plazmida pYM16 opisanog u poglavlju 3.1.2.2. i početnica opisanih u poglavlju 3.1.2.3. Uspješnost umnažanja provjerena je gel elektroforezom DNA.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za PCR

KOMPONENTA	VOLUMEN (µl)
Taq reakcijski pufer (10x)	5
10 µM početnica fwd	3,2
10 µM početnica rev	3,2
10 mM deoksiribonukleotidi	1,75
DNA kalup (plazmid pYM16)	1
Taq DNA polimeraza	0,5
Sterilna H ₂ O	35,35

Tablica 4. Program za PCR

1.	95°C	5 min
2.	95°C	30 s
	54°C	30 s
	68°C	2 min 40 s
3.	95°C	30 s
	54°C	30 s
	68°C	2 min 40 s +20 s/ciklus
4.	68°C	5 min

3.2.2. Colony PCR

Ova metoda koristi za se umnažanje sekvence DNA lokusa *MAT*, odnosno određivanje tipa parenja kvasca. Otprilike 10% kolonije kvasca prenese se u 30 µl 0,2%-tne otopine SDS-a te se otopina vorteksira 15 sekundi. Otopina se zatim zagrije u termo bloku u trajanju od 4 min pri temperaturi od 90°C. Nakon toga, otopina se centrifugira 2 min pri 8000 rpm i supernatant koji sadrži ekstrakt DNA se prenese u novu Eppendorf epruvetu. Potom se 1 µl ovako pripremljenog ekstrakta DNA koristi za PCR reakciju uz početnice opisane u poglavlju 3.1.2.3. Ekstrakt DNA se čuva pri -20°C.

Tablica 5. Sastav reakcijske smjese za PCR

KOMPONENTA	VOLUMEN (µl)
Taq reakcijski pufer (10x)	5
10 µM početnica MAT	5
10 µM početnica MATa	5
10 µM početnica MATα	5
10 mM deoksiribonukleotidi	1
25% Triton X-100	2
DNA ekstrakt	1
Taq DNA polimeraza	0,5
Sterilna voda	26,5

Tablica 6. Program za PCR

1. 95 °C 1 min	
2. 95 °C 30 s	} 35x
58 °C 1 min	
68 °C 1 min	
3. 68 °C 1 min	

3.2.3. Gel elektroforeza DNA

U ovom radu korištena je horizontalna elektroforeza DNA u 1-2% (ovisno o veličinama analiziranih fragmenata) agaroznom gelu pripremljenom otapanjem agaroze u TAE puferu. Uzorci za elektroforezu pomiješani su s bojom za nanošenje uzoraka te injektirani u jažice gela uronjenog u TAE pufer u kadici za elektroforezu. Elektroforeza je provođena pri 80 V, a gel je nakon elektroforeze bojan u otopini etidij bromida i vizualiziran pod UV svjetlom.

3.2.4. Određivanje koncentracije DNA pomoću uređaja Qubit fluorimetar

Koncentracija DNA određena je pomoću uređaja Qubit 3.0 (Invitrogen) i seta kemikalija "dsDNA BR Assay kit", prema uputama proizvođača.

3.2.5. Restriksijska analiza

Restriksijska analiza provedena je za provjeru sekvence kazete BGL2-HA. Pritom su korišteni restriksijski enzimi BglII i XbaI, a analiza je provedena prema uputama proizvođača. Produkti restriksijske analize potom su analizirani gel elektroforezom DNA.

3.2.6. Transformacija kvasca

Stanice kvasca uzgojene su u tekućoj YPD podlozi do logaritamske faze rasta. Izdvojen je volumen kulture koji je sadržavao oko 10 OD jedinica kvasca te je centrifugiran 5'/3000 rpm. Talog stanica potom je ispran sterilnom deioniziranom vodom pa 0,1 M otopinom litijevog

acetata, pri čemu je prebačen u sterilnu Eppendorf epruvetu. Na talog stanica potom je, redom, dodano 240 μ l 50%-tnog PEG-a 4000, 36 μ L 1 M otopine litijevog acetata, 25 μ l denaturirane DNA sperme lososa te ukupno 50 μ l otopine transformirajuće DNA (10 μ g u slučaju transformacije kazetom za označavanje) i sterilne deionizirane vode. Smjesa je vorteksirana 1' pa inkubirana 30'/30°C. Slijedio je temperaturni šok, odnosno inkubacija smjese 20'/42°C. Smjesa je potom centrifugirana 15 s/8000 rpm, a talog stanica resuspendiran je u 5 ml tekuće YPD podloge, pri čemu prebačen u Falcon epruvetu, te inkubiran 3-4 sata u tresilici pri 30°C. Nakon centrifugiranja (5'/3000 rpm), talog stanica je resuspendiran u 100 μ l sterilne vode i naciepljen na krutu YPD podlogu s antibiotikom higromicinom. Podloge su inkubirane pri 30°C do porasta kolonija, nakon čega je selekcija transformanata ponovljena na svježoj krutoj YPD podlozi s higromicinom.

3.2.7. Parenje kvasca

Haploidne stanice kvasca različitog tipa parenja naciepljene su u tekuću YPD podlogu te je suspenzija stanica inkubirana preko noći u tresilici pri 30°C. Nakon inkubacije, 100 μ l suspenzije stanice naciepljeno je na krutu YNB podlogu bez metionina i lizina u svrhu selekcije diploidnih stanica. Podloge su inkubirane pri 30°C do porasta kolonija, a uspješnost parenja provjerena je metodom colony PCR, kako je opisano u poglavlju 3.2.2.

3.2.8. Izolacija staničnih stijenki

Stanice kvasca uzgojene su u 50 ml tekuće YPD podloge do logaritamske faze rasta. Cijeli volumen je centrifugiran 5'/3000 rpm te je talog stanica dvaput ispran deioniziranom vodom i jednom 50 mM K-fosfatnim puferom pH 8. Talog stanica je potom resuspendiran u otprilike 500 μ l 50 mM K-fosfatnog pufera pH 8 u Eppendorf epruveti, dodane su staklene kuglice (jednak volumen kao volumen suspenzije stanice) i stanice su razbijene korištenjem uređaja BeadBug (Benchmark Scientific) pri 4000 rpm. Stanični ekstrakt izdvojen je od staklenih kuglica te je centrifugiran 1'/8000 rpm. Supernatant je odbačen, a talog staničnih stijenki ispran je četiri puta s 1 ml 50 mM K-fosfatnog pufera pH 8.

3.2.8.1. *Tretman staničnih stijenki vrijućim SDS-om*

Talog staničnih stijenki resuspendiran je u 1 ml Laemmli pufera za kuhanje (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 mM EDTA III, 2% SDS, 0,001% bromfenol plavo, 5% β -merkaptetoetanol). Uzorak je kuhan 10 minuta u vrijućoj vodenoj kupelji, nakon čega je centrifugiran 2'/8000 rpm. Supernatant (=SDS ekstrakt) je odvojen u novu Eppendorf epruvetu i čuvan pri -20°C do SDS elektroforeze i western blot analize.

3.2.9. Izolacija svih proteina

Stanice kvasca uzgojene su do eksponencijalne faze rasta u tekućoj YPD podlozi. Izdvojen je volumen kulture koji je sadržavao oko 10 OD jedinica kvasca te je centrifugiran 5'/3000 rpm. Talog stanica resuspendiran je u 200 μ l pufera za lizu stanica (0,1 M NaOH, 50 mM EDTA III, 2% SDS, 2% β -merkaptetoetanol) i prenesen u Eppendorf epruvetu te je inkubiran u termo bloku pri 90°C u trajanju od 10 min. Nakon toga, otopini je dodano 5 μ l 4 M octene kiseline uz vorteksiranje od 30 s te je ponovno inkubirana u termobloku 10 min pri 90°C. Otopini je zatim dodano 50 μ l pufera za uzorke (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 50% glicerol, 0,05% metilensko modnilo). Ekstrakt je čuvan pri -20°C do SDS elektroforeze i western blot analize.

3.2.10. SDS elektroforeza

Uzorci su pomiješani s Laemmli puferom za uzorke (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 mM EDTA III, 10% glicerol, 2% SDS, 0,001% bromfenol plavo, 5% β -merkaptetoetanol) te su nanoseni u jažice prethodno pripremljenog poliakrilamidnog gela koji se sastojao od gela za sabijanje i gela za razdvajanje. Sastav gela za sabijanje bio je: 4,5% akrilamid, 0,12% N,N'-metilenbisakrilamid, 0,1% SDS, 0,075% N, N, N', N'-tetrametiletildiamin (TEMED) i 7,5% amonij-persulfat (APS) u 0,5 M Tris-HCl puferu pH 6,8. Sastav 10% gela za razdvajanje bio je: 10% akrilamid, 0,3% N,N'-metilenbisakrilamid, 0,1% SDS, 0,05% TEMED i 5% APS u 1,5 M Tris-HCl puferu pH 8,8. Elektroforeza je provedena pri 180 V u Mini-PROTEAN (Biorad) kadici za proteinsku elektroforezu u puferu za SDS elektroforezu (25 mM Tris-glicin pH 6,8, 0,1% SDS).

3.2.11. Western blot

Nakon SDS elektroforeze, proteini su iz gela prenijeti na nitroceluloznu membranu na principu polu-suhog prijenosa u Towbin puferu za prijenos (25 mM Tris, 192 mM glicin pH 8.3, 20% metanol) pomoću uređaja Trans-Blot Turbo (Biorad), prema uputama proizvođača. Nakon prijenosa, membrana je inkubirana u otopini boje Ponceau S (0,1% Ponceau S u 5%-tnoj očetnoj kiselini). Standardi su označeni na membrani grafitnom olovkom, a membrana je potom odbojana deioniziranom vodom. Membrana je potom inkubirana u puferu za blokiranje (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, uz dodatak 1% obranog mlijeka u prahu) 1 h uz treskanje. Nakon toga, pufer za blokiranje zamijenjen je puferom za blot (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100) u koji je dodano 4 µl komercijalnog anti-HA antijela te je inkubirano 1,5 h uz treskanje. Membrana je potom isprana puferom za blot 3 puta. Nakon ispiranja membrane, standardi su označeni uz pomoć WesternSure Pen (LI-COR) te je membrana inkubirana u otopinama Clarity Western ECL Blotting Substrate (Biorad). Membrana je vizualizirana uz pomoć skenera C-Digit Blot Scanner (LI-COR).

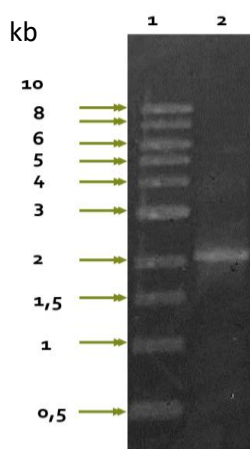
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

Cilj ovoga rada bio je konstruirati set diploidnih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kojima su jedna, odnosno obje kopije gena *BGL2* označene hemaglutininskom sekvencom, kako bi se omogućila uspostava semi-kvantitativne western blot metode za analizu proteina stanične stijenke. Prvo su konstruirani haploidni sojevi kvasca oba tipa parenja kojima je gen *BGL2* označen hemaglutininskom sekvencom. Nadalje, parenjem odgovarajućih haploidnih sojeva konstruirani su diploidni sojevi te su proteinski ekstrakti ovih sojeva podvrgnuti semi-kvantitativnoj western blot analizi.

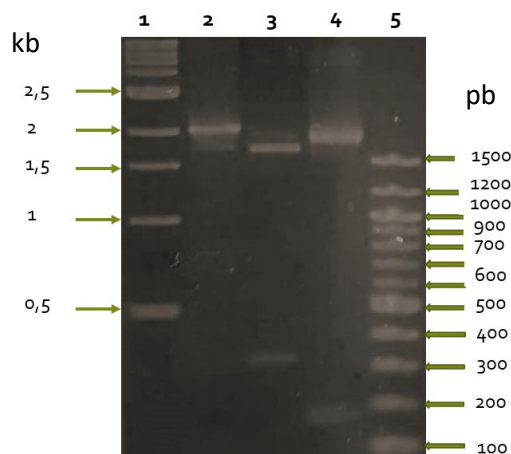
4.1.1. Označavanje gena *BGL2* hemaglutininskom sekvencom u haploidnim sojevima kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

U svrhu označavanja gena *BGL2* hemaglutininskom sekvencom u haploidnim sojevima, prvo je lančanom reakcijom polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) konstruirana kazeta za obilježavanje. Kao kalup u PCR reakciji korišten je plazmid pYM16 koji sadrži slijed nukleotida koji kodira za hemaglutininsku oznaku te marker gen koji stanicama omogućava rezistenciju na antibiotik higromicin (Janke i sur., 2004), a korištene početnice su na krajevima bile produžene slijedovima od 45 nukleotida istovjetnima onima prije, odnosno nakon STOP kodona gena *BGL2* (vidi Materijale i metode). Uspješnost PCR reakcije provjerena je gel elektroforezom u agaroznom gelu. Nakon provedene elektroforeze vidljiva je vrpca veličine oko 2000 pb, što odgovara očekivanoj veličini kazete za označavanje (slika 2).



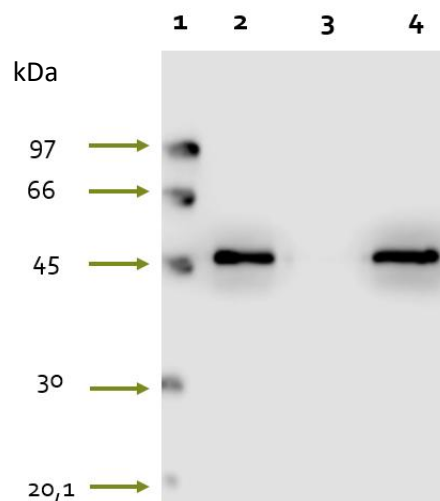
Slika 2. Provjera uspješnosti PCR reakcije. 1. standardi (NEB 1 kb DNA ladder), 2. umnoženi PCR produkt *BGL2*-HA.

Sekvenca nukleotida umnoženog fragmenta provjerena je restrikcijom analizom. Za restrikcijsku analizu korišteni su restrikcijski enzimi BglII i XbaI, koji cijepaju kazetu na jednom mjestu, dajući fragmente veličine 1730 pb i 326 pb, odnosno 1884 pb i 172 pb. Dobiveni produkti analizirani su gel elektroforezom DNA. Na slici 3 vidljivo je da su dobiveni produkti očekivanih veličina, na temelju čega se može zaključiti da je kazeta za označavanje uspješno konstruirana.



Slika 3. Provjera sekvenca umnoženog fragmenta restrikcijskom analizom. 1. standardi (NEB 1 kb DNA ladder), 2. nepocjepana kazeta BGL2-HA, 3. kazeta BGL2-HA pocjepana s BglII, 4. kazeta BGL2-HA pocjepana sa XbaI, 5. standardi (NEB 100 pb DNA ladder).

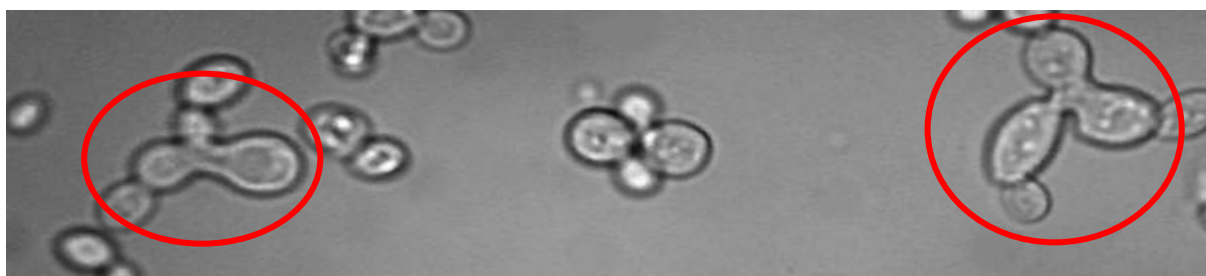
Umnoženom kazetom za označavanje transformirani su haploidni sojevi kvasca BY4741 (**a** tipa parenja) i BY4742 (**α** tipa parenja) litij-acetatnom metodom. Stanice kod kojih je došlo do ugradnje ove kazete u genom selekcionirane su na podlozi s antibiotikom higromicinom, a uspješnost označavanja gena *BGL2* u transformantima ispitana je kvalitativnom western blot analizom. Ukratko, stanice transformanata uzgojene su do eksponencijske faze rasta, izolirane su stanične stijenke te su kuhanjem u vrijućem SDS-u pri reducirajućim uvjetima selektivno izolirani nekovalentno vezani proteini stanične stijenke (Mrša i sur., 1997). Dobiveni proteinski ekstrakti analizirani su SDS elektroforezom u poliakrilamidnom gelu, prenijeti su na nitroceluloznu membranu na kojoj je označeni protein Bgl2-HA vizualiziran pomoću anti-HA antitijela konjugiranog s enzimom peroksidazom na principu kemiluminiscencije. U proteinskim ekstraktima transformanata detektirana je vrpca veličine oko 50 kDa (slika 4), što je u skladu s prethodno dobivenim rezultatima za protein Bgl2-HA eksprimiran s komercijalnog plazmida pBG1805 (neobjavljeni rezultati iz laboratorija), čime je potvrđeno da je gen *BGL2* u haploidnim sojevima uspješno označen hemaglutininskom sekvencom.



Slika 4. Provjera uspješnosti označavanja Bgl2 hemaglutininskom oznakom western blot analizom. 1. standardi (LMW), 2. SDS ekstrakt soja BY4741 *BGL2-HA*, 3. SDS ekstrakt soja BY4741 (wt), 4. SDS ekstrakt soja BY4742 *BGL2-HA*.

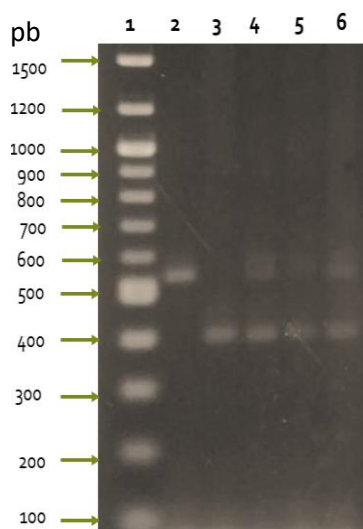
4.1.2. Konstrukcija seta diploidnih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kojima su jedna, odnosno dvije kopije gena *BGL2* označene hemaglutininskom sekvencom

Prethodno konstruirani haploidni sojevi podvrgnuti su procesu parenja. Proces parenja praćen je pod svjetlosnim mikroskopom uočavanjem izduženih stanica i zigota (slika 5). Za konstrukciju diploidnih sojeva u kojima je hemaglutininskom sekvencom označena jedna kopija gena *BGL2* (sojevi BY4743 *BGL2-HA/BGL2* i BY4743 *BGL2 /BGL2-HA*), u istoj hranjivoj podlozi inkubirane su stanice haploida s označenim genom *BGL2* te stanice haploida divljeg tipa suprotnog tipa parenja. Za konstrukciju diploidnog soja u kojemu su hemaglutininskom sekvencom označene obje kopije gena *BGL2* (soj BY4743 *BGL2-HA/BGL2-HA*), u istoj hranjivoj podlozi inkubirane su stanice haploida s označenim genom *BGL2* oba tipa parenja. Također, konstruirane su stanice diploida divljeg tipa (soj BY4743). Nakon parenja, stanice diploida selekcionirane su na podlozi bez lizina i metionina na osnovi komplementarne auktrofije ishodnih haploida suprotnih tipova parenja.



Slika 5. Zigote kvasca *Saccharomyces cerevisiae* vizualizirane svjetlosnim mikroskopom.

Za provjeru uspješnosti parenja, odnosno konstrukcije diploidnih sojeva, korištena je metoda colony PCR. Za PCR reakciju je korišten set od tri početnice koje su komplementarne sekvencama *MATa* i *MATb* te sekvenci uzvodno od lokusa *MAT*, zbog čega se s genomskom DNA haploida umnaža samo jedan fragment, a u slučaju diploida oba fragmenta (Huxley i sur., 1990). Produkti PCR-a analizirani su gel elektroforezom DNA te je pokazano da su iz genomске DNA konstruiranih diploida umnožena dva fragmenta, što je potvrda da su diploidni sojevi uspješno konstruirani (slika 6).

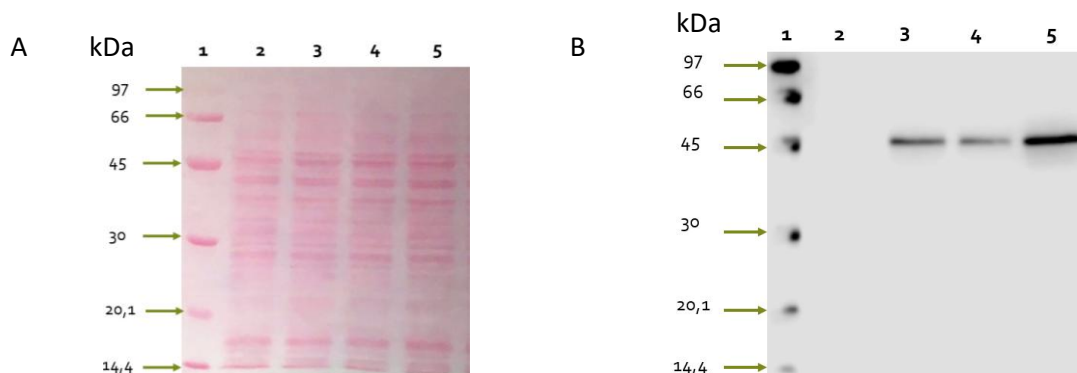


Slika 6. Provjera uspješnosti konstrukcije diploidnih sojeva metodom colony PCR. 1. standardi (NEB 100 bp DNA ladder), 2. PCR produkt umnožen iz genomске DNA haploida **a** tipa parenja, 3. PCR produkt umnožen iz genomске DNA haploida **b** tipa parenja, 4.-6. PCR produkti umnoženi iz genomске DNA konstruiranih diploida.

4.1.3. Semi-kvantitativna western blot analiza proteina Bgl2 u proteinskim ekstraktima konstruiranih diploidnih sojeva

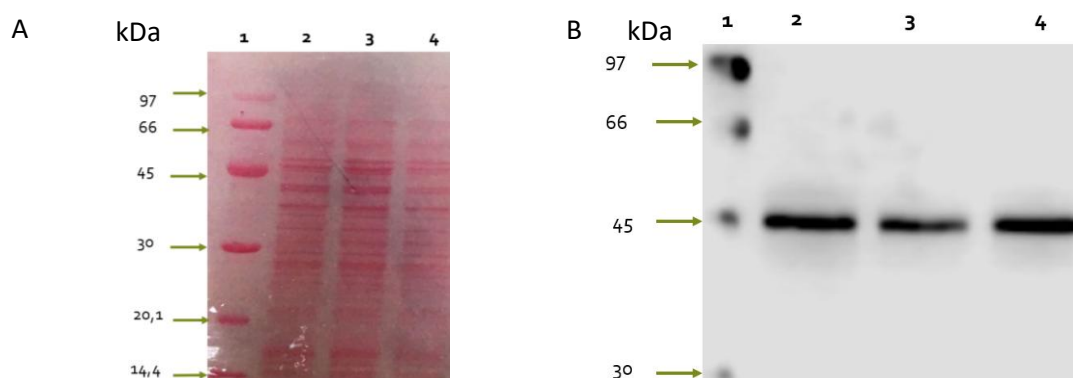
Stanice konstruiranih diploidnih sojeva uzgojene su do eksponencijalne faze rasta te su iz njih izolirani svi proteini lizom stanica u vrijućem lužnatom SDS-u pri reducirajućim uvjetima (von der Haar, 2007). Dobiveni proteinski ekstrakti analizirani su semi-kvantitativnom western blot analizom. U tu svrhu, proteinski ekstrakti prvo su analizirani SDS elektroforezom u poliakrilamidnom gelu, nakon čega su preneseni na nitroceluloznu membranu. Bojanjem s Ponceau S nespecifično su vizualizirane proteinske vrpce na membrani te je potvrđeno da su nanesene približno jednake količine svih proteinskih ekstrakata (slika 7A). Membrana je zatim odbojana te podvrgnuta postupku blokiranja u otopini mlijeka u prahu, nakon čega je inkubirana

s antitijelom anti-HA konjugiranim s enzimom peroksidazom. Nakon ispiranja membrane, protein Bgl2-HA vizualiziran je na membrani na principu kemiluminiscencije. Pokazana je jasno vidljiva razlika u intenzitetu signala vrpce proteina Bgl2-HA iz proteinskog ekstrakta diploida kojemu su jedna, odnosno dvije kopije gena *BGL2* označene hemaglutinskom sekvencom (slika 7B).



Slika 7. Semi-kvantitativna western blot analiza proteina Bgl2-HA. Prikazana je ista membrana vizualizirana bojanjem s Ponceau S (A) i kemiluminiscencijom (B). 1. standardi (LMW) 2. BY4743, 3. BY4743 *BGL2-HA BGL2*, 4. BY4743 *BGL2 / BGL2-HA*, 5. BY4743 *BGL2-HA/BGL2-HA*

Također, provedena je semi-kvantitativna western blot analiza na način kao što je prethodno opisano, osim što je na SDS elektroforezu nanoseno dvostruko više proteinskog ekstrakta diploidnih sojeva kojima je jedna kopija gena *BGL2* označena, nego proteinskog ekstrakta diploidnog soja kojemu su obje kopije gena *BGL2* označene. Bojanjem membrane s Ponceau S potvrđena je ova razlika u nanošenju (slika 8A), a vizualizacijom proteina Bgl2-HA pokazano je da su vrpce jednakog intenziteta (slika 8B). Na temelju navedenoga može se zaključiti da je ova semi-kvantitativna western blot analiza pogodna za analizu razlika u količini proteina stijenke Bgl2-HA u proteinskim ekstraktima.



Slika 8. Semi-kvantitativna western blot analiza proteina Bgl2-HA. Prikazana je ista membrana vizualizirana bojanjem s Ponceau S (A) i kemiluminiscencijom (B). 1. standardi (LMW), 2. BY4743 *BGL2-HA/BGL2*, 3. BY4743 *BGL2 / BGL2-HA*, 4. BY4743 *BGL2-HA/BGL2-HA*

4.2. Rasprava

Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* određuje morfološke karakteristike stanice, kao što su oblik i čvrstoća, te doprinosi integritetu stanice tijekom rasta, diobe i stresnih okolišnih uvjeta (Lesage i Bussey, 2006). Ova organela je građena najvećim dijelom od polisaharida glukana i hitina (85%) te proteina (15%) (Nguyen-Queyrens i sur., 1998). Proteini stanične stijenke uglavnom su manoproteini te ih je dosad identificirano oko 20, a funkcija većine još nije poznata (Mrša i Tanner, 1999). Poznato je da su proteini stijenke ugrađeni u stijenkuputem nekovalentnih i kovalentnih veza s glukanskom mrežom. Nevalentno vezani proteini stijenke selektivno se izoliraju kuhanjem stijenki u SDS-u pri reducirajućim uvjetima, a kovalentno vezani proteini stijenke tretmanom stijenki glukanzama ili blagom lužinom, ovisno o vrsti kovalentne veze (Mrša i sur., 1997).

Cilj ovog rada bio je uspostaviti semi-kvantitativnu western blot analizu proteina stanične stijenke. Eksperimentalna strategija korištena u radu uključivala je označavanje gena *BGL2* hemaglutininskom sekvencom, što omogućuje jednostavnu detekciju nevalentno vezanog proteina stijenke Bgl2-HA western blot analizom pomoću komercijalno dostupnih anti-HA antitijela. U radu je kazeta za označavanje konstruirana metodom PCR te provjerena restrikcijskom analizom. Potom su ovom kazetom transformirani haploidni sojevi kvasca divljeg tipa, oba tipa parenja, a uspješnost označavanja je provjerena kvalitativnom western blot analizom. Nadalje, parenjem stanica kvasca suprotnih tipova parenja je konstruiran set diploidnih sojeva: sojevi kojima je hemaglutininskom sekvencom označena jedna kopija gena *BGL2* te soj kojemu su hemaglutininskom sekvencom označene dvije kopije gena *BGL2*. Uspješnost konstrukcije diploidnih sojeva provjerena je metodom colony PCR. Konstruirani diploidni sojevi korišteni su za uspostavu semi-kvantitativne western blot analize proteina stanične stijenke.

Semi-kvantitativna western blot analiza podrazumijeva relativnu kvantifikaciju, odnosno usporedbu količine proteina u različitim uzorcima. Kako bi se navedeno postiglo, uspoređuje se intenzitet signala vrpce proteina od interesa u različitim uzorcima, pri čemu je rezultate potrebno normalizirati. Dvije strategije koje se pritom koriste su normalizacija obzirom na količinu konstitutivno eksprimiranog proteina (engl. *housekeeping protein*) u uzorcima te normalizacija obzirom na ukupnu količinu proteina u uzorcima. U sklopu prve strategije često se provodi normalizacija obzirom na količinu proteina aktina, tubulina ili glicerinaldehid-3-fosfat-dehidrogenaze (Ghosh i sur., 2014) te ova strategija nužno zahtijeva dodatni korak inkubacije membrane s antitijelom specifičnim za korišteni protein kako bi se omogućila njegova vizualizacija. Nadalje,

ekspresija proteina prema kojemu se radi normalizacija može varirati u proučavanim eksperimentalnim uvjetima, a zbog tipično visoke razine ekspresije ovih proteina zbog zasićenja signala nije moguće u istim uzorcima točno analizirati razinu znatno slabije eksprimiranih proteina od interesa (Ghosh i sur., 2014). Zbog navedenoga se sve češće koristi strategija normalizacije na ukupnu količinu proteina u uzorku, što se provodi bojanjem membrane s Ponceau S ili Coomassie Brilliant Blue, koje se nespecifično vežu na proteine (Thacker i sur., 2015). U ovome je radu kao strategija normalizacije odabrano reverzibilno bojanje membrane s Ponceau S nakon prijenosa proteina, budući da je pokazano kao pouzdana, jednostavna i jeftina metoda normalizacije (Romero-Calvo i sur., 2010). Nadalje, da bi se olakšao postupak pripreme proteinskih ekstrakata koji se analiziraju, umjesto metode za selektivnu izolaciju proteina stanične stijenke (Mrša i sur., 1997) korištena je metoda za izolaciju svih proteina kvasca koja uključuje kuhanje cijelih stanica u lužnatom SDS-u pri reducirajućim uvjetima (von der Haar, 2007). Prethodno je pokazano da je ova metoda pogodna za brzu i jednostavnu kvantitativnu ekstrakciju unutarstaničnih proteina kvasca (von der Haar, 2007). Međutim, zbog toga što stanična stijenka predstavlja netopljivu komponentnu staničnog ekstrakta, bilo je potrebno potvrditi uspješnost ekstrakcije proteina stijenke u otopinu pomoću opisane metode. Ova je metoda korištena za izolaciju proteina iz stanica konstruiranih diploidnih sojeva. Proteini u ekstraktima razdvojeni su SDS elektroforezom u poliakrilamidnom gelu, preneseni su na nitroceluloznu membranu koja je zatim bojana s Ponceau S. Nakon odbojavanja, membrana je blokirana otopinom mlijeka u prahu pa inkubirana s antitijelom anti-HA, nakon čega je protein Bgl2-HA vizualiziran na principu kemiluminiscencije. Bojanjem membrane s Ponceau S potvrđeno je da proteinski ekstrakti različitih diploidnih sojeva sadrže približno jednake količine proteina (slika 7A). Nadalje, pokazana je jasna razlika u intenzitetu signala proteinske vrpce koja odgovara proteinu Bgl2-HA u ekstraktima diploidnih sojeva kojima je jedna, odnosno dvije kopije gena *BGL2* označene hemaglutininskom sekvencom (slika 7B). Na temelju navedenoga može se zaključiti da opisana metoda ekstrakcije proteina omogućava pouzdanu ekstrakciju proteina stijenke Bgl2-HA te da je semi-kvantitativna western blot analiza pri kojoj se bojanje s Ponceau S koristi kao metoda normalizacije pogodna za relativnu kvantifikaciju proteina Bgl2-HA u proteinskim ekstraktima.

5. ZAKLJUČCI

1. Provedeno je uspješno označavanje gena *BGL2* hemaglutininskom sekvencom u haploidnim sojevima kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Provedena je uspješna konstrukcija seta diploidnih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kojima su jedna, odnosno dvije kopije gena *BGL2* označene hemaglutininskom sekvencom.
3. Pomoću konstruiranih diploidnih sojeva, uspostavljena je semi-kvantitativna western blot metoda za analizu proteina stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

6. POPIS LITERATURE

Blow, J. J. i Tanaka, T. U. (2005) 'The chromosome cycle: coordinating replication and segregation', *EMBO reports*, **6**(11), str. 1028–1034.

Burnette, W. N. (1981) "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A', *Analytical Biochemistry*, **112**(2), str. 195–203.

Cappellaro, C., Mrsa, V., Tanner, W. (1998) 'New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating', *Journal of Bacteriology*, **180**(19), str. 5030–5037.

Castillo, L. i sur. (2003) 'Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: The repetitive sequence is needed for binding to the cell wall β -1,3-glucan', *Yeast*, **20**(11), str. 973–983.

Corley, R. B. (2005) *A guide to methods in the biomedical sciences, A Guide to Methods in the Biomedical Sciences*.

Dean, N. (1999) 'Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, str. 309–322.

Dempski, R. E., Imperiali, B. (2002) 'Oligosaccharyl transferase: Gatekeeper to the secretory pathway', *Current Opinion in Chemical Biology*, str. 844–850.

Elsztein, C., de Lucena, R. M., de Moraes, M. A. (2011) 'The resistance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to the biocide polyhexamethylene biguanide: involvement of cell wall integrity pathway and emerging role for YAP1', *BMC Molecular Biology*, **12**(1), str. 38.

Elsztein, C., De Menezes, J. A. S., De Moraes, M. A. (2008) 'Polyhexamethyl biguanide can eliminate contaminant yeasts from fuel-ethanol fermentation process', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **35**(9), str. 967–973.

Geoghegan, I., Steinberg, G., Gurr., S. (2017) 'The Role of the Fungal Cell Wall in the infection of Plants', *Trends in Microbiology*, str. 56–59.

Gonzalez, M., Lipke, P. N., Ovalle, R. (2009) 'Chapter 15 GPI Proteins in biogenesis and structure of yeast cell walls', *Enzymes*, str. 321–356.

- De Groot, P. W. J., Ram, A. F., Klis, F. M. (2005) 'Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls', *Fungal Genetics and Biology*, str. 657–675.
- Harper, S., Speicher, D. W. (2005) 'Electroblotting From Polyacrylamide Gels', in *Handbook of Food Analytical Chemistry*, str. 185–198.
- Herskowitz, I. (1988) 'Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*.', *Microbiological reviews*, **52**, str. 536–553.
- Ikezawa, H. (2002) 'Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins.', *Biological & pharmaceutical bulletin*, 25(April), str. 409–417.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., Knop, M. (2004) 'A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes', *Yeast*, **21**(11), str. 947–962.
- Joshi, M., Deshpande, J. D. (2011) 'Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application', *International Journal of Biomedical Research*, **2**(1), str. 81–97.
- Kalebina, T. S., Farkaš, V., Laurinavichuite, D.K., Gorlovoy, P.M., Fominov, G.V., Bartek, P., Kulaev, I.S. (2003) 'Deletion of BGL2 results in an increased chitin level in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, **84**(3), str. 179–184..
- Kalebina, T. S., Plotnikova, T.A., Gorkovski, A.A., Selyakh, I.O., Galzitskaya, O.V., Bezsonov, E.E., Gellissen, G., Kulaev, I.S. (2008) 'Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p', *Prion*, **2**(2), str. 91–96.
- Kang, M. S., Elango, M., Mattia, E., Au-Young, J., Robbins, P.W., Cabib, E. (1984) 'Isolation of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification of an enzyme by entrapment in the reaction product', *Journal of Biological Chemistry*, **259**(23), str. 14966–14972.
- Klebl, F., Tanner, W. (1989) 'Molecular cloning of a cell wall exo-1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Bacteriology*, **171**(11), str. 6259–6264.
- Kollar, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P.W., Cabib, E. (1995) 'Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan', *Journal of Biological Chemistry*, **270**(3), str. 1170–1178.

- Kurien, B. T., Scofield, R. H. (2009) 'Nonelectrophoretic bidirectional transfer of a single SDS-PAGE gel with multiple antigens to obtain 12 immunoblots.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **536**, str. 55–65..
- Lagorce, A., Hauser, N.C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arrovo, J., Hoheisel, J.D., Francois, J. (2003) 'Genome-wide Analysis of the Response to Cell Wall Mutations in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Biological Chemistry*, **278**(22), str. 20345–20357.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Chin-Yuan, H., Yong, H.K. (2012) 'Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments.', *Journal of visualized experiments : JoVE*, **62**, str. 1–5.
- Lenormand, T., Engelstadter, J., Johnston, S.E., Winjker, E., Haag, C.R. (2016) 'Evolutionary mysteries in meiosis', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **371**(1706), str. 20160001.
- Lesage, G., Bussey, H. (2006) 'Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*.' *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **70**(2), str. 317–43.
- De Lucena, R. M., Elsztein, C., Simoes, D.A., De Morais, M.A. (2012) 'Participation of CWI, HOG and Calcineurin pathways in the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to low pH by inorganic acid', *Journal of Applied Microbiology*, **113**(3), str. 629–640.
- Mahmood, T., Yang, P. C. (2012) 'Western blot: Technique, theory, and trouble shooting', *North American Journal of Medical Sciences*, **4**(9), str. 429–434..
- Montijn, R. C., Van Risum, J., Van Schagen, F.A., Klis, F.M. (1994) 'Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain', *Journal of Biological Chemistry*, **269**(30), str. 19338–19342.
- Mrša, V., Ecker, M., Strahl-Bolsinger, S., Nimtz, M., Lehle, L., Tanner, W. (1999) 'Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Bacteriology*, **181**(10), str. 3076–3086.
- Mrša, V., Klebl, F., Tanner, W. (1993) 'Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* BGL2 gene product, a cell wall endo-beta-1,3-glucanase', *Journal of Bacteriology*, **175**(7), str. 2102–2106.

Mrša, V., Seidl, T., Gentzsch, M., Tanner, W. (1997) 'Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*', *Yeast*, **13**(12), str. 1145–1154.

Mrša, V., Tanner, W. (1999) 'Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall.', *Yeast (Chichester, England)*, **15**(10A), str. 813–820.

Nguyen-Queyrens, A., Ferhi, A., Loustan, D., Guehl, M.J. (1998) 'Within-ring delta C-13 spatial variability and interannual variations in wood cellulose of two contrasting provenances of *Pinus pinaster*', *Canadian Journal of Forest Research*, **28**, str. 766–773.

O'Connor, C. (2008) *Mitosis and Cell Division*, *Nature education*, str. 34-42.

Ohishi, K., Inoue, N., Kinoshita, T. (2001) 'PIG-S and PIG-T, essential for GPI anchor attachment to proteins, form a complex with GAA1 and GPI8', *EMBO Journal*, **20**(15), str. 4088–4098.

Orlean, P. (2012) 'Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall.', *Genetics*, **192**(3), str. 775–818.

Ovalle R., Lim, S.T., Holder, B., Jue, C.K., Moore, C.W., Lipke, P.N. (1998) 'A spheroplast rate assay for determination of cell wall integrity in yeast', *Yeast (Chichester, England)*, **14**, str. 1159–1166.

Pringle, J. R., Hartwell, L. H. (1981) 'The *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle', *Cold Spring Harbor Monograph Archive; Volume 11*(1981): *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*.

Renart, J., Reiser, J., Stark, G. R. (1979) 'Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76**(7), str. 3116–3120.

De Sampaio, G., Bourdineaud, J. P., Lauquin, G. J. M. (1999) 'A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: Cell wall targeting', *Molecular Microbiology*, **34**(2), str. 247–256.

Sentandreu, R., Northcote, D. H. (1968) 'The structure of a glycopeptide isolated from the yeast cell wall.', *The Biochemical journal*, **109**(3), str. 419–32.

- Sabirzyanov FA, Sabirzyanova TA, Rekstina VV, Adzhubei AA, Kalebina TS (2018.) 'C-Terminal sequence is involved in the incorporation of Bgl2p glucanosyltransglycosylase in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*', *FEMS yeast research* **18**(1)
- Sestak, S., Hagen, I., Tanner, W., Strahl, S. (2004) 'Scw10p, a cell-wall glucanase/transglucosidase important for cell-wall stability in *Saccharomyces cerevisiae*', *Microbiology*, **150**(10), str. 3197–3208.
- Sherman, F. (1991) 'Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology', *Methods in Enzymology*, **194**, str. 3–21.
- Sherman, F. (2002) 'ScienceDirect.com - Methods in Enzymology - Getting started with yeast', *Methods in enzymology*.
- Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M., Tanner, W. (1999) 'Protein O-mannosylation', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, str. 297–307.
- Tamarin, H. R. (1999) Principles of genetics, 6. izd, McGraw-Hill
- Teparić, R., Mrša, V. (1997) 'Purification of yeast periplasmic proteins using protein adsorption to glucan', *Food Technology and Biotechnology*, **35**(1), str. 29–32.
- Teparić, R., Mrša, V. (2013) 'Proteins involved in building, maintaining and remodeling of yeast cell walls', *Current Genetics*, **59**(4), str. 171–185.
- Teparić, R., Stuparević, I., Mrsa, V. (2004) 'Increased mortality of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein mutants.', *Microbiology*, **150**, str. 3145–50.
- Teparić, R., Stuparević, I., Mrša, V. (2010) 'Incorporation of homologous and heterologous proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall', *Food Technology and Biotechnology*, **48**(3), str. 317–328.
- Terashima, H., Yabuki, N., Arisawa, M., Hamada, K., Kitada, K. (2000) 'Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of FKS1 in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Molecular & general genetics : MGG*, **264**, str. 64–74.
- Towbin, H., Staehlin, T. (1979) 'Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with

antibody', *Anal. Biochem*, **112**, str. 195–203.

Valentin-Hansen, P., Hammer-Jespersen, K., Boetius, F., Svendsen, F., Svendsen, I. (1984) 'Structure and function of the intercistronic regulatory deoC-deoA element of *Escherichia coli* K-12.', *The EMBO journal*, **3**(1), str. 179–83.

Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Delvaux, F.R. (2003) 'Yeast flocculation: what brewers should know', *Applied Microbiology and Biotechnology*, **61**(3), str. 197–205.

Vishwakarma, R., Ruhela, D. (2009) Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchoring of Proteins, *The Enzymes*

Von der Haar T (2007.) Optimized protein extraction for quantitative proteomics of yeasts. *PloS One* 2: e1078

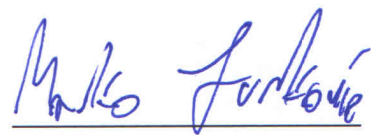
Yang, N., Yu, Z., Jia, D., Xie, Z., Zhang, K., Xia, Z., Lei, L., Qiao, M. (2014) 'The contribution of Pir protein family to yeast cell surface display', *Applied microbiology and biotechnology*.

Yin, Q. Y., de Groot, P.W., Dekker, H.L., de Yong, L., Klis, F.M., de Koster, C.G. (2005) 'Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: Identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages', *Journal of Biological Chemistry*, **280**(21), str. 20894–20901.

Yun, D. J., Zhao, Y., Pardo, J.M., Narasimhan, M.L., Damsz, B., Hyeseung, L., Abad, L.R., Urzo, M.P., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (1997) 'Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**(13), str. 7082–7

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Marko Jurković